





دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل
دانشکده پزشکی
پایان نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان :

**بررسی تاثیر آلئسین در جلوگیری از انسداد کاتترهای ادراری توسط پروتئوس میرابیلیسی در مدل
مثانه مصنوعی**

استاد راهنما :

دکتر محسن ارزنلو

اساتید مشاور :

دکتر هادی پیری

دکتر مجتبی امانی

نگارش:

حامد ایمانی راد

شماره پایان نامه: 030

تابستان ۹۶

بسمه تعالی

دانشکده پزشکی و پراپزشکی

صورت جلسه دفاع

با تاییدات خداوند متعال و استعانت از حضرت ولی عصر (عج) جلسه دفاع از پایان نامه آقای حامد ایمانی راد، در رشته کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، تحت عنوان "بررسی تاثیر آلپسین در جلوگیری از انسداد کاتترهای ادراری توسط پروتئوس میراییلیس در مدل مثانه مصنوعی" با حضور اساتید راهنما و هیئت داوران در محل دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در تاریخ 96/6/1 تشکیل و با موفقیت دفاع گردید. نامبرده نمره 17/82، با حروف هفده و هشتاد و دو، با امتیاز بسیار خوب را دریافت نمود.

هیئت داوران:

دکتر کیوان امیرشاهرخی

دکتر رقیه تیمورپور

دکتر بهنام محمدی

نماینده دانشگاه:

دکتر محمد قاسم گل محمدی

استاد راهنما:

دکتر محسن ارزنلو

رییس دانشکده پزشکی:

دکتر اکبر پیرزاده

اساتید مشاور:

دکتر هادی پیری

دکتر مجتبی امانی

تقدیم به

پدر و مادر بزرگوارم

به پاس همه کوشش ها و فداکاری هایشان

و به همه اعضای خانواده ام

تقدیر

مَنْ لَمْ يَشْكُرِ الْمُنْعِمَ مِنَ الْمَخْلُوقِينَ لَمْ يَشْكُرِ اللَّهَ عَزَّ وَ جَلَّ

پس از حمد و سپاس باری تعالی که هر توفیقی به لطف اوست، بر خود لازم می دانم از زحمات اساتید گرامی و عزیزانی که مرا در انجام مراحل مختلف این رساله یاری کرده اند تشکر و قدردانی نمایم:

جناب آقای دکتر محسن ارزنلو استاد راهنمای محترم، که در تمام مراحل انجام این رساله و در طول تحصیل از حسن اخلاق، راهنمایی ها و یاری بی دریغشان بهره مند بوده ام.

جناب آقای دکتر هادی پیری و جناب آقای دکتر مجتبی امانی اساتید مشاور گرامی، که با دقت و همکاری بسیار مشاوره این رساله را بر عهده داشتند.

جناب آقای دکتر نوروز نجف زاده، مدیر گروه محترم گروه آناتومی، که آنالیز آماری این رساله به پاس راهنمایی و مساعدت ایشان به انجام رسید.

جناب آقای مهندس علیرضا محمدنیا، که مرا مورد لطف خود قرار داده و یاری و مساعدت ایشان در طول انجام این رساله بسیار برایم راهگشا بوده است.

جناب آقای پیمان آذغانی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب شناسی، که در انجام مراحل مختلف این رساله مرا یاری نمودند.

سرکار خانم دکتر صاحب الزمانی، که زحمت ساخت مدل های مthane مصنوعی را عهده دار شدند.

در پایان از پروردگار متعال برای تمام سروران و دوستانی که به هر نحو در انجام این رساله مرا یاری دادند، طلب بهروزی، شادکامی و موفقیت را دارم.

چکیده:

بررسی تأثیر آلئسین در جلوگیری از انسداد کاتترهای ادراری توسط پروتئوس میرابیلیس در مدل مثانه مصنوعی

سابقه و هدف: تشکیل سنگ های ادراری و انسداد کاتترها از عوارض مهم عفونت های ادراری ناشی از گونه های پروتئوس محسوب می شوند. آنزیم اوره آز پروتئوس عامل اصلی در ایجاد این انسداد است. ممانعت از فعالیت اوره آز می تواند از عوارض عفونت ادراری ناشی از این باکتری از جمله انسداد کاتتر جلوگیری نماید. این مطالعه با هدف بررسی اثر آلئسین در جلوگیری از کریستالیزاسیون و انسداد کاتتر در مدل مثانه مصنوعی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه آلئسین با روش HPLC نیمه کمی از عصاره سیر خالص سازی گردید. مطالعه ممانعت از کریستالیزاسیون ادرار مصنوعی ناشی از فعالیت آنزیم اوره آز پروتئوس میرابیلیس در حضور غلظت های مختلف آلئسین، کنترل بدون آلئسین و مهار کننده شناخته شده اوره آز (یدواستیک اسید) در داخل لوله آزمایش در مدت 24 ساعت انجام شد. پارامترهایی مانند تغییرات pH، کدورت و میزان یون های منیزیم و کلسیم اندازه گیری و کریستال ها در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. در بخش دوم مطالعه اثر غلظت های زیر MIC آلئسین در انسداد کاتتر در مدل مثانه مصنوعی در حضور کنترل های ذکر شده در بالا مطالعه گردید. پارامترهایی مانند تغییرات pH، زمان انسداد و شدت جریان ادرار خروجی اندازه گیری شد. انسداد کاتترها با استفاده از تصویربرداری نشان داده شد و در نهایت میزان رسوب یون های منیزیم و کلسیم در داخل کاتترها اندازه گیری شد.

یافته ها: در مطالعه ممانعت از کریستالیزاسیون، آلئسین بصورت وابسته به دوز بطور معناداری در مقایسه با کنترل بدون آلئسین سرعت افزایش pH ادرار مصنوعی را به میزان قابل توجهی کاهش داد و متعاقب آن افزایش کدورت و رسوب یون های منیزیم و کلسیم نیز بطور معنا داری کاهش پیدا کرد. زمان تشکیل کریستال ها نیز به تاخیر افتاد، بطوری که در غلظت 32 $\mu\text{g/ml}$ بعد از گذشت مدت زمان 24 ساعت بعد از انکوباسیون هیچ کریستالی در ادرار مصنوعی تشکیل نشد.

در مطالعه انسداد کاتتر در مدل مثانه مصنوعی آلئسین به شکل وابسته به دوز زمان انسداد کاتتر را به شکل معنا داری در مقایسه با کنترل بدون آلئسین افزایش داد. زمان انسداد کامل کاتتر در عدم حضور آلئسین 48 ساعت بود. با افزودن آلئسین زمان انسداد کامل کاتتر ها افزایش قابل توجهی یافت. زمان انسداد برای غلظت های 8 و 4 و 2 $\mu\text{g/ml}$ به ترتیب تا 61، 74 و 92 ساعت افزایش یافت.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که آلیسین بطور موفقیت آمیزی توانست در غلظت های زیر MIC با مهار فعالیت اوره آزی پروتئوس میرابیلیس زمان انسداد کاتتر های ادراری را تا دو برابر افزایش دهد.

کلمات کلیدی: آلیسین، پروتئوس میرابیلیس، اوره آز، ادرار مصنوعی، مثانه مصنوعی، کریستالیزاسیون، کاتتر، انسداد

فهرست مطالب

فصل اول : طرح تحقیق

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۱ مقدمه و بیان مساله

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۱ اهداف و فرضیات

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۱ هدف اصلی

Error! Bookmark not defined.----- ۳-۲-۱ اهداف اختصاصی

Error! Bookmark not defined.----- ۴-۲-۱ فرضیات یا سؤالات تحقیق

Error! Bookmark not defined.----- ۵-۲-۱ اهداف کاربردی

Error! Bookmark not defined.----- ۶-۲-۱ تعریف واژه‌های کلیدی

فصل دوم : پیشینه تحقیق

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲ میکروبیولوژی پروتئوس

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۱-۲ جنس پروتئوس

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۱-۲ مورفولوژی

Error! Bookmark not defined.----- ۳-۱-۲ خصوصیات بیوشیمیایی

Error! Bookmark not defined.----- ۴-۱-۲ خصوصیات کشت

Error! Bookmark not defined.----- ۵-۱-۲ سوارمینگ

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۵-۱ عوامل ممانعت کننده سوارمینگ

Error! Bookmark not defined.-----۶-۱-۲ فاکتورهای ویروالانس پروتئوس

Error! Bookmark not defined.-----۱-۶-۱-۲ ساختارهای سطحی

Error! Bookmark not defined.-----۱-۱-۶-۱-۲ نقش فیمبریه در اتصال

Error! Bookmark not defined.-----MR/P ۱-۱-۱-۶-۱-۲ فیمبریه

Error! Bookmark not defined.-----MR/K ۲-۱-۱-۶-۱-۲ فیمبریه

Error! Bookmark not defined.-----PMF ۳-۱-۱-۶-۱-۲ فیمبریه

Error! Bookmark not defined.-----NAF ۴-۱-۱-۶-۱-۲ فیمبریه

Error! Bookmark not defined.-----۲-۱-۶-۱-۲ فلاژل

Error! Bookmark not defined.-----۳-۱-۶-۱-۲ پروتئین غشای خارجی

Error! Bookmark not defined.-----۴-۱-۶-۱-۲ لیپوپلی ساکارید

Error! Bookmark not defined.-----۵-۱-۶-۱-۲ آنتی ژن های کپسولی

Error! Bookmark not defined.-----۲-۶-۱-۲ توکسین ها و آنزیم ها

Error! Bookmark not defined.-----۳-۶-۱-۲ اوره آز

Error! Bookmark not defined.-----۱-۳-۶-۱-۲ منابع میکروبی اوره آز

Error! Bookmark not defined.-----۲-۳-۶-۱-۲ ساختار و ژنتیک اوره آز

Error! Bookmark not defined.-----۳-۳-۶-۱-۲ تنظیم ساخت اوره آز

Error! Bookmark not defined.-----۱-۳-۳-۶-۱-۲ ظهور ذاتی

Error! Bookmark not defined.-----۲-۳-۳-۶-۱-۲ تنظیم وابسته به نیتروژن

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۳-۳ القاء بوسیله اوره

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۳-۴ تنظیم بوسیله pH

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۴ نقش اوره آزهای باکتریایی در بیماریزایی

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۴ سنگ های عفونی

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۴ پیلونفریت

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۴ آنسفالوپاتی آمونیاک، آنسفالوپاتی هپاتیک و کمای هپاتیک
defined.

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۴ غیرفعال سازی کمپلمان

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۵ انسداد کاتترهای ادراری

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۵ مهارکننده های اوره آز

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۵ اسیدهای هیدروکسامیک

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۵ فسفر دی آمیدات

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۵ ایمیدازول ها

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۶-۳-۵ ترکیبات واکنش دهنده با تیول

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۲ سیر

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۲ ترکیبات شیمیایی سیر

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۲-۲ مشخصات آلیسین

Error! Bookmark not defined.----- ۳-۲-۲ فعالیت ضد میکروبی آلیسین

..... بررسی آلیسین

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۳-۲-۲ فعالیت ضد قارچی آلیسین

Error! Bookmark not defined.----- ۳-۳-۲-۲ فعالیت ضد انگلی آلیسین

Error! Bookmark not defined.----- ۴-۲-۲ مکانیسم عمل آلیسین

فصل سوم : بررسی متون

فصل چهارم : مواد و روش ها

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۴ مواد، وسایل و دستگاه های مورد استفاده

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۱-۴ محیط کشت های مورد استفاده

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۱-۴ مواد مورد استفاده

Error! Bookmark not defined.----- ۳-۱-۴ دستگاه های مورد استفاده

Error! Bookmark not defined.----- ۴-۱-۴ وسایل مورد استفاده

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۴ محلول های مورد استفاده

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۲-۴ سرم فیزیولوژی

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۲-۴ استاندارد نیم مک فارلند

Error! Bookmark not defined.----- ۳-۲-۴ معرف برای سنجش اوره آز

Error! Bookmark not defined.----- ۳-۴ استخراج و اندازه گیری آلیسین

Error! Bookmark not defined.----- ۱-۳-۴ تهیه عصاره متانولی سیر

Error! Bookmark not defined.----- ۲-۳-۴ دستگاه HPLC

۴-۳-۴ تغلیظ آلیسین جمع آوری شده ----- **Error! Bookmark not defined.**

۵-۳-۴ آنالیز کمی محتوای آلیسین ----- **Error! Bookmark not defined.**

۱-۵-۳-۴ مشخصات دستگاه و روش کروماتوگرافی ----- **Error! Bookmark not defined.**

۲-۵-۳-۴ تهیه استاندارد داخلی ۱۵ میکرو گرم بر میلی لیتر ----- **Error! Bookmark not defined.**

۳-۵-۳-۴ آماده سازی آلیسین جهت تزریق ----- **Error! Bookmark not defined.**

۴-۵-۳-۴ رسم منحنی استاندارد جهت اندازه گیری مقادیر کمی آلیسین --- **Error! Bookmark not defined.**

۵-۵-۳-۴ اندازه گیری غلظت آلیسین استخراج شده ----- **Error! Bookmark not defined.**

۴-۴ اندازه گیری فعالیت اوره آزی ----- **Error! Bookmark not defined.**

۱-۴-۴ مطالعه اثر مهارى آلیسین بر اوره آز باکتریایی ----- **Error! Bookmark not defined.**

۲-۴-۴ رسم منحنی استاندارد با آمونیاک و اندازه گیری فعالیت اوره آزی -- **Error! Bookmark not defined.**

۳-۴-۴ اندازه گیری میزان پروتئین در لیزات باکتری ----- **Error! Bookmark not defined.**

۵-۴ تهیه ادرار مصنوعی ----- **Error! Bookmark not defined.**

۱-۵-۴ مواد لازم به همراه غلظت ها ----- **Error! Bookmark not defined.**

۲-۵-۴ نحوه آماده سازی ----- **Error! Bookmark not defined.**

۶-۴ تعیین MIC آلیسین در ادرار مصنوعی ----- **Error! Bookmark not defined.**

۷-۴ تعیین pH_n در ادرار مصنوعی ----- **Error! Bookmark not defined.**

Error! Bookmark not defined. ۸-۴ مطالعه اثر مهاري آلئسین در کریستالیزاسیون ادرار مصنوعی

defined.

Error! Bookmark not defined. ۱۰-۴ مطالعه اثر مهاري آلئسین بر انسداد کاتتر در مدل مثانه مصنوعی

Error! Bookmark not defined. ۱-۱۰-۴ تعریف مدل و شرایط کار

Error! Bookmark not defined. ۲-۱۰-۴ پروتکل آزمایش

فصل پنجم : نتایج

Error! Bookmark not defined. ۱-۵ استخراج آلئسین از عصاره متانولی سیر به روش HPLC نیمه کمی

Error! Bookmark not defined. ۲-۵ منحنی استاندارد و اندازه گیری آلئسین

Error! Bookmark not defined. ۳-۵ مطالعه اثر ضد میکروبی آلئسین

Error! Bookmark not defined. ۴-۵ منحنی استاندارد آمونیاک

Error! Bookmark not defined. ۵-۵ مهار اوره آز توسط آلئسین

Error! Bookmark not defined. ۶-۵ منحنی pH_n ادرار مصنوعی

۷-۵ مطالعه تغییرات pH ، کدورت و رسوب یون های منیزیم و کلسیم ادرار مصنوعی در حضور آلئسین

Error! Bookmark not defined.

Error! Bookmark not defined. ۱-۷-۵ تاثیر آلئسین بر تغییرات pH و کدورت

Error! Bookmark not defined. ۲-۷-۵ تاثیر آلئسین بر میزان رسوب یون های کلسیم و منیزیم

۸-۵ تشکیل کریستال های آپاتیت و استروویت در ادرار مصنوعی در حضور لیقات پروتئوس میرابیلیس در مجاورت با غلظت های مختلف آلئسین.-----**Error! Bookmark not defined.**

۹-۵ تاثیر آلئسین در جلوگیری از انسداد کاتتر های ادراری در مدل مثانه مصنوعی **Error! Bookmark not defined.**

۹-۵-۱ تصاویر مربوط به چشمی، و مقطع عرضی، کاتتر -----**Error! Bookmark not defined.**

۹-۵-۳ میزان زنده مانی باکتری -----**Error! Bookmark not defined.**

۹-۵-۴ میزان یون های کلسیم و منیزیم در کاتتر های ادراری مدل مثانه مصنوعی - **Error! Bookmark not defined.**

۱۰-۵ آنالیز آماری----- ۷۲

فصل ششم: بحث و نتیجه گیری

۱-۶ بحث -----**Error! Bookmark not defined.**

۲-۶ نتیجه گیری -----**Error! Bookmark not defined.**

۳-۶ پیشنهادات -----**Error! Bookmark not defined.**

منابع -----**Error! Bookmark not defined.**

فهرست شکل ها

- شکل ۴-۱. مدل مثانه مصنوعی و ابعاد آن ----- ۴۸
- شکل ۴-۲. وضعیت ستاپ شده مثانه مصنوعی ----- ۴۹
- شکل ۵-۱. نمونه کروماتوگرام عصاره سیر ----- ۵۲
- شکل ۵-۲. نمونه کروماتوگرام آلئسین خالص شده در کنار استاندارد داخلی ----- ۵۳
- شکل ۵-۳. نمونه کروماتوگرام آلئسین استاندارد در کنار استاندارد داخلی ----- ۵۴
- شکل ۵-۴. منحنی استاندارد اندازه گیری غلظت آلئسین ----- ۵۵
- شکل ۵-۵. منحنی استاندارد آمونیاک ----- ۵۶
- شکل ۵-۶. تغییرات جذب نوری در مقابل غلظت های آلئسین در لیزات پروتئوس میرابیلیس ----- ۵۷
- شکل ۵-۷. درصد فعالیت باقی مانده آنزیم در غلظت های آلئسین در لیزات پروتئوس میرابیلیس ----- ۵۷
- شکل ۵-۸. منحنی pH_n ----- ۵۸

- شکل ۵-۹. تغییرات pH ادرار مصنوعی در اثر فعالیت اوره آزی لیزات در حضور غلظت های آلیسین ---- ۵۹
- شکل ۵-۱۰. تغییرات OD ادرار مصنوعی در اثر فعالیت اوره آزی لیزات در حضور غلظت های آلیسین - ۵۹
- شکل ۵-۱۱. نمودار تغییرات غلظت یون کلسیم در ادرار مصنوعی در حضور غلظت های آلیسین ----- ۶۰
- شکل ۵-۱۲. نمودار تغییرات غلظت یون منیزیم در ادرار مصنوعی در حضور غلظت های آلیسین ----- ۶۱
- شکل ۵-۱۳. نمودار تغییرات غلظت یون کلسیم در ادرار مصنوعی در حضور غلظت های آلیسین ----- ۶۲
- شکل ۵-۱۴. کاتتر های جدا شده از مدل مثانه مصنوعی مربوط به غلظت های آلیسین ----- ۶۵
- شکل ۵-۱۵. کاتتر های جدا شده از مدل مثانه مصنوعی مربوط به کنترل ها ----- ۶۶
- شکل ۵-۱۶. نمودار تغییرات pH ادرار خروجی ----- ۶۷
- شکل ۵-۱۷. نمودار شدت جریان ادرار خروجی ----- ۶۷
- شکل ۵-۱۸. نمودار تغییرات تعداد باکتری ها در غلظت های آلیسین در ۱۲ ساعت ----- ۶۸
- شکل ۵-۱۹. نمودار تغییرات تعداد باکتری ها در غلظت های آلیسین در ۲۴ ساعت ----- ۶۹
- شکل ۵-۲۰. نمودار تغییرات تعداد باکتری ها در غلظت های آلیسین در ۴۸ ساعت ----- ۶۹
- شکل ۵-۲۱. غلظت یون کلسیم در کاتتر های جدا شده از مدل مثانه مصنوعی ----- ۷۰
- شکل ۵-۲۲. غلظت یون منیزیم در کاتتر های جدا شده از مدل مثانه مصنوعی ----- ۷۱

فهرست جدول ها

- جدول ۴-۱. محیط های مورد استفاده و اجزای تشکیل دهنده آن ها ----- ۳۵
- جدول ۴-۲. مواد شیمیایی مورد استفاده برای آماده سازی ادرار مصنوعی ----- ۴۵
- جدول ۵-۱. نتایج MIC بدست آمده برای 4 ایزوله پروتئوس در ادرار مصنوعی ----- ۵۵
- جدول ۵-۲. زمان های انسداد کاتتر ----- ۶۶

